

HPGD ve *SMAD3* Genlerindeki Nükleotid Değişimlerinin Kanser ve Dijital Çomak Parmaklılık ile İlişkisi

[Lack of Association Between *HPGD* and *SMAD3* Gene Nucleotide Changes and Digital Clubbing Cases With Cancer]

¹Nilüfer Şahin Calapoğlu,

²Mustafa Calapoğlu,

¹Mustafa Soyöz,

³Muhammad Tariq,

³Wasim Ahmad,

⁴Mithat Kerim Aslan

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

³Quaid-i-Azam Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İslamabad, Pakistan

⁴Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
32260 Çünür-Isparta, Türkiye
Tel: 0 246 2113340
Faks: 0 246 2371165
e-mail: nilufersahin@yahoo.com

Kayıt tarihi : 19 Mart 2009 ; Kabul tarihi : 17 Ağustos 2009

[Received : 19 March 2009 ; Accepted : 17 August 2009]

ÖZET

Amaç: Otozomal resesif kalıtmı izole konjenital çomak parmaklıktan sorumlu tutulan tek gen olan *HPGD*, prostaglandin metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir enzim kodlamaktadır. Smad ailesi üyesi olan *SMAD3*, üzerindeki değişikliklerin çeşitli kanserlerde görülmesi nedeniyle muhtemel tümör baskılayıcı genler arasında gösterilmektedir. Bu çalışmada, dijital çomak parmaklılık ve kanser görülen yedi kuşaklı bir ailede *HPGD* ve *SMAD3* gen mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışma grubu, dijital çomak parmaklılığın ve birçok farklı kanser türünün görüldüğü 7 kuşaklı bir aile ile sağlıklı kontrol bireylerden oluşmaktadır. *HPGD* ve *SMAD3* genleri nükleotid değişimleri açısından DNA dizi analizi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Ailede belirlenen *SMAD3* tek nükleotid polimorfizmlerinin biyokimyasal karakterizasyonu da yapılmıştır.

Bulgular: DNA dizi analizi neticesinde *HPGD* geninde, ailede hastalık fenotipini ortaya çıkarabilecek herhangi bir fonksiyonel dizi varyantı belirlenmemiştir. Fakat bu çalışmada, *SMAD3* geninde ilk kez c.1278G>A tek nükleotid polimorfizmi ve daha önce tanımlanmış olan IVS2+59C>G, c.309A>G ve c.508A>G polimorfizmleri tespit edilmiştir. Kodon 170'deki tek nükleotid polimorfizmine (c.508A>G) ait genotip ve allel frekansları hasta ve kontrol grubu arasında değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Fakat bu polimorfizmin aile içerisinde etkilenmiş bireylerin yanı sıra sağlıklı bireylerde de görüldüğü tespit edilmiştir. Biyokimyasal araştırmalar sonucunda, bu polimorfizmler ile dijital çomak parmaklılık arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, açıklanamayan dijital çomak parmaklılık ve kanser patogenezinde *HPGD* ve *SMAD3* genlerinin bu aile için etkin rol oynamadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *HPGD*, *SMAD3*, çomak parmaklılık, kanser, mutasyon

ABSTRACT

Objectives: *HPGD* encoding an enzyme that plays an important role on regulation of prostaglandin metabolism is the only gene underlines autosomal recessive isolated congenital nail clubbing. *SMAD3* gene is a member of Smad family, are possibly tumor suppressor genes because alterations of these genes occurred in various carcinomas. The aim of this study was examined *HPGD* and *SMAD3* mutations in seven-generation family with digital clubbing and cancer.

Methods: The study group consisted of a seven-generation family with clinical features of digital clubbing and different types of cancer, and healthy controls. The family members and control group were evaluated for *HPDG* and *SMAD3* gene mutations by DNA sequencing method. The present study also focused on biochemical characterization of *SMAD3* single nucleotide polymorphisms in the family.

Results: DNA sequencing analysis of the *HPGD* gene identified no functional sequence variant causing disease-phenotype in the family. But in this study, a novel single nucleotide polymorphism c.1278G>A and three previously described polymorphisms IVS2+59C>G, c.309A>G, c.508A>G were identified in *SMAD3* gene. Only A/G transition in codon 170 was found significant but this polymorphism was segregated with the affected and unaffected members of the family. Biochemical examination did not show statistically significant correlation between *SMAD3* polymorphisms and digital clubbing.

Conclusion: These findings suggest that the *HPGD* and *SMAD3* genes may not play an important role in the pathogenesis of unexplained digital clubbing and cancer in this family.

Key Words: *HPGD*, *SMAD3*, digital clubbing, cancer, mutation

Giriş

Dijital çomak parmak (DC), tırnak matriksi ve distal parmak kemiği arasındaki bağ dokununun proliferasyonunun artması sonucunda parmaklardaki tırnak tabanı ve terminal segmentinin genişleyerek saat camı görünümünü alması ile karakterizedir. Çomak parmaklılık akciğer kanseri, akciğer apsesi, amfizem, akciğer fibrozisi, kronik tüberküloz, doğuştan morarmalı kalp hastalıkları, kalp iç zarı iltihabı, siroz ve iltihaplı bağırsak hastalıklarının bir işareti olarak ortaya çıkabilmektedir. Nadir olarak rastlanan dijital çomak parmaklılık ise herhangi bir hastalığa bağlı olmadan, ailesel olarak da görülebilmektedir (1).

Geniş genom taramaları sonucunda, otozomal resesif kalıtmı izole konjenital çomak parmaklılığın (ICNC) görüldüğü 6 kuşaklı Pakistanlı bir ailede 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaz (*15-PGDH*) geninin bulunduğu bölgeye (4q32.3) bağlantı gösterdiği belirlenmiştir. DNA dizi analizi sonucunda *15-PGDH* geninin 6. ekzonunda belirlenen homozigot yanlış anlam mutasyonunun (c.577T<C) ICNC'ye sebep olduğu tespit edilmiştir. *HPGD* geni (MIM 601688) NAD⁺ bağımlı 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaz enzimini (EC: 1.1.1.141) kodlamaktadır. *HPGD* enzimi prostaglandin metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. *HPGD* proteinin 193. pozisyonundaki serin amino asitinin proline dönüşümüne (p.S193P) neden olan mutasyonu taşıyan homozigot ICNC'li bireylerin prostaglandin E₂ (PGE₂) seviyelerinde hafif artış gözlenmiştir (2).

Transforme edici büyüme faktörü β (TGF-β) ailesi, gelişimi çok yönlü kontrol eden hücre dışı büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF-β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir. TGF-β ailesinin üyesi olan TGF-β, hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahip multifonksiyonel bir sitokindir (3, 4).

TGF-β, iki tip reseptör olan serin/treonin protein kinazları biraraya getirerek gen ifadenmesini düzenler. Bu kinazlardan biri diğerini fosforiller, fosforillenen kinaz Smad proteinlerine dönüşür. Smadlar, hücre çekirdeği içine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA'ya bağlanma kabiliyeti ile transkripsiyonel kompleks oluşturan bir protein ailesidir (3-5).

Sinyal iletiminde, TGF-β kendine özgül reseptöre bağlandıktan sonra Smad2/3 proteinleri fosforillenir ve Smad4 ile birleşir. Bu kompleks hücre çekirdeğine taşınır ve DNA'ya bağlanarak spesifik genlerin transkripsiyonunu düzenler. TGF-β sinyal iletiminde önemli bir hücre içi aracı molekül olan *SMAD3*'ün sessizleştirilmesi ile yapılan hayvan deneylerinde, *SMAD3*'ün kolon kanserlerinde tümör gelişimine katkıda bulunduğu ve diğer bir çalışmada insan osteoartritine benzer dejeneratif eklem hastalığının bu farelerde ortaya çıktığı bulunmuştur (3, 6).

TGF-β, birçok normal dokuda ve erken fazdaki lezyonlarda büyüme inhibitörüdür. Buna rağmen TGF-β aktivitesi, geç dönem kanserlerde büyüme ve metastazi kolaylaştırır. TGF-β sinyalinde azalma ile hayvan modellerinde ve hasta insan örneklerindeki tümör ilerlemesi ve metastatik potansiyelin artışı arasında bir ilişki gözlenmiştir. TGF-β büyüme kontrolünün kaybına, tümör hücrelerinin artan motilitesine, TGF-β üretiminin artmasına ve fibroblast-aracılı hücre dışı matriks ekspresyonu ve angiogeneze yol açmaktadır. Artan TGF-β, normal ve transforme edilen epitel hücrelerde epitelden mezenşimal geçişi (EMT) indüklemekte ve bu da göç kabiliyetini arttırmaktadır. Smad-bağımlı ve Smad-bağımsız sinyal iletim yolları, TGF-β'nin indüklediği EMT de işe karışarak kötü huylu hücrelerde invazif ve metastatik özelliklerin artmasına neden olmaktadır (7).

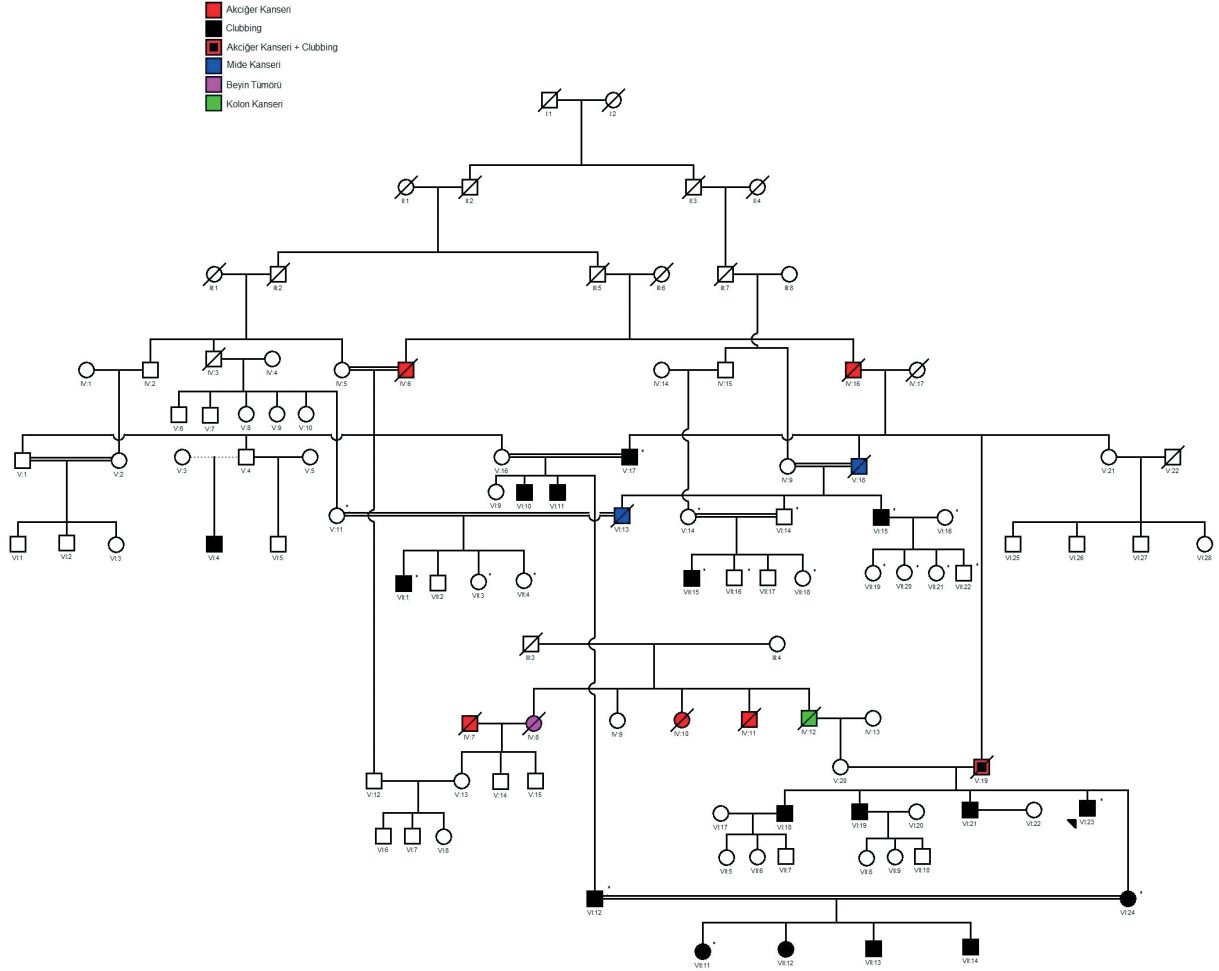
SMAD3'ün tümör baskılayıcı fonksiyonunun olup olmadığı tartışmalı olmasına rağmen yetersiz ekspresyonunun karsinogenezde rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Dijital çomak parmaklılıkta megakaryosit ve trombositlerin kümeleşmesine bağlı olarak damar epitelyal büyüme faktörü (VEGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve bazı stokinler aracılığıyla stromal ve vasküler değişikliklerin olduğu bilinmektedir (8). Vaskülaritede, permeabilitede ve konnektif dokuda oluşan değişiklikler çomak parmaklılığın belirteçleridir. *SMAD3* ve hipoksi ile indüklenen faktör-1α (HIF1-α) TGF-β ile birlikte güçlü bir anjiyogenik faktör olan VEGF'nin ekspresyonunu indüklemektedir (9).

Bu çalışmada, ICNC'ye sebep olduğu ortaya konmuş olan *HPGD* gen mutasyonlarının belirlenmesinin yanı sıra dijital çomak parmaklılığın ve kanserin patogenezinde rol oynayan VEGF seviyeleri üzerinde etkili olan *SMAD3* gen mutasyon veya polimorfizmlerinin bu ailede görülen dijital çomak parmaklılık ve kanser ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ayrıca, *SMAD3* nükleotid değişimlerinin Türk popülasyonundaki frekansları da belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntemler

Çalışma Grubu

Bu çalışma, otozomal resesif kalıtım gösteren dijital çomak parmaklılığın ve akciğer kanseri başta olmak üzere mide, kolon ve beyin kanseri vakalarının görüldüğü 7 kuşaklı bir aileye üye 20 birey ve aile ile herhangi bir akrabalığı olmayan 40 sağlıklı kontrol birey ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Kontrol grubunun seçimi sırasında, bu kişilerde ve birinci derece akrabalarında kanser ve çomak parmaklılık durumunun bulunmamasına özellikle dikkat edilmiştir. Çalışma grubuna ait DNA örnekleri ile *HPGD* ve *SMAD3* genlerinin protein kodlayan dizileri ve intron-ekzon bağlantı bölgeleri mutasyon ve polimorfik değişiklikler açısından değerlendirilmiştir. Bu değişimlerin aile üzerinden çomak parmaklılık ve kanser ile ilişkileri araştırılmıştır. Çalışma grubuna dahil edilen her bireye hasta onam formu onaylatılmıştır.



Şekil 1. Otozomal resesif kalıtım gösteren dijital çomak parmaklılık ve kanser vakaları görülen aileye ait pedigr. Ok indeks vakayı, daire sembolü bayanları, kare sembolü erkekleri, çift çizgi akraba evliliğini ifade etmektedir. Siyah semboller dijital çomak parmak fenotipine sahip bireyleri, kırmızı, pembe, yeşil, mavi sırasıyla akciğer, beyin, kolon, mide kanserlerine sahip bireyleri, kırmızı siyah sembol ise akciğer kanseri ve aynı zamanda dijital çomak parmaklığa sahip bireyi göstermektedir. Yıldız (*) işareti kan ve DNA örneklerinin alındığı bireyleri ifade etmektedir. Her bir sembolün altında yer alan kuşak ve birey numarası Tablo 1’de tanımlanan bireylere karşılık gelmektedir.

Moleküler ve Biyokimyasal Analizler

Araştırma ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin tümünün klinik sorgulamaları ve muayeneleri uzman hekim tarafından yapılmış olup yine hekim kontrolünde brakial venden EDTA’lı tam kan ve düz biyokimya kan örnekleri alınmıştır. EDTA’lı tam kan örneklerinden moleküler genetik çalışmalar için kandan DNA izolasyon kiti (Genra) kullanılarak DNA izolasyonları yapılmıştır.

HPGD geninin kodlayan 6 ekzonu ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri doğrudan DNA dizi analizi (ABI 3100 DNA Analizörü) ile, SMAD3 geninin kodlayan 9 ekzonu ve ekzon intron bağlantı bölgeleri de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildikten sonra, Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) yöntemi ile taranmış ve farklı bant göçü gözlenen ekzonlar devamında DNA dizi analizi ile değerlendirilmiştir.

Bu bireylere ait kan örnekleri biyokimyasal olarak böbrek ve karaciğer fonksiyonları, lipid profili, anemi tablosu, tiroid fonksiyonları ve neoplazi oluşumunu belirleme amacıyla tümör belirteçleri açısından taranmıştır. Yine bu bireylere ait el-parmak ve akciğer grafileri ile görülebilecek değişiklikler belirlenmeye çalışılmıştır.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 10.0 paket programından yararlanılmıştır. Tanımlayıcı analizler, paket programı içindeki “descriptive” fonksiyonu ile yapılmıştır. Aile bireyleri ve kontrol grubu genotip ve fenotip allel frekans karşılaştırmalarında standart “ki-kare” ve “Fischer Exact” testleri kullanılmıştır. Biyokimyasal parametrelerin istatistik değerlendirmesi Kruskal-Wallis testi kullanılarak yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Yapılan direkt DNA dizi analizi neticesinde ailedeki hasta ve sağlıklı bireylere ait DNA örneklerinde *HPGD* geninin kodlayan 6 ekzonda ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinde herhangi bir nükleotid değişimine rastlanmamıştır. PCR-SSCP analizi neticesinde ise *SMAD3* geninin 2., 3. ve 9. ekzonları için normalden farklı bant göçü gözlenmiştir.

SMAD3 geninin 2. ekzonunda 5 farklı bant paterni gözlenirken DNA dizi analizi yapılan örneklerde iki ayrı noktada nükleotid değişimi olduğu belirlenmiştir. İlk olarak, ekzon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A/G transisyonu (c.309A>G) (rs1065080) tespit edilmiştir (Şekil 2A). Ailedeki 20 kişiden 8'inin (% 40) homozigot A/G değişimine, diğer 12 kişinin (% 60) ise heterozigot genotipe sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 1). Kontrol bireylerinde ise c.309A>G transisyonu % 40 heterozigot, % 60 ise homozigot olarak belirlenmiştir. Aile ve kontrol bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 2).

Beş farklı bant paterni alınmasına neden olan ikinci değişimin ise intron 2'nin 59. pozisyonundaki G/C transversiyonu (IVS2+59 G>C) (rs2289261) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2B). Bu varyantın ailedeki frekansları (G/G), heterozigot (G/C) ve homozigot (C/C) için sırasıyla % 20 (4/20), % 55 (11/20) ve % 25 (5/20) olarak bulunmuştur. Sağlıklı kontrollerde ise bu oranlar sırasıyla % 32.5 (13/40), % 45.0 (18/40) ve % 22.5 (9/40) olarak belirlenmiştir.

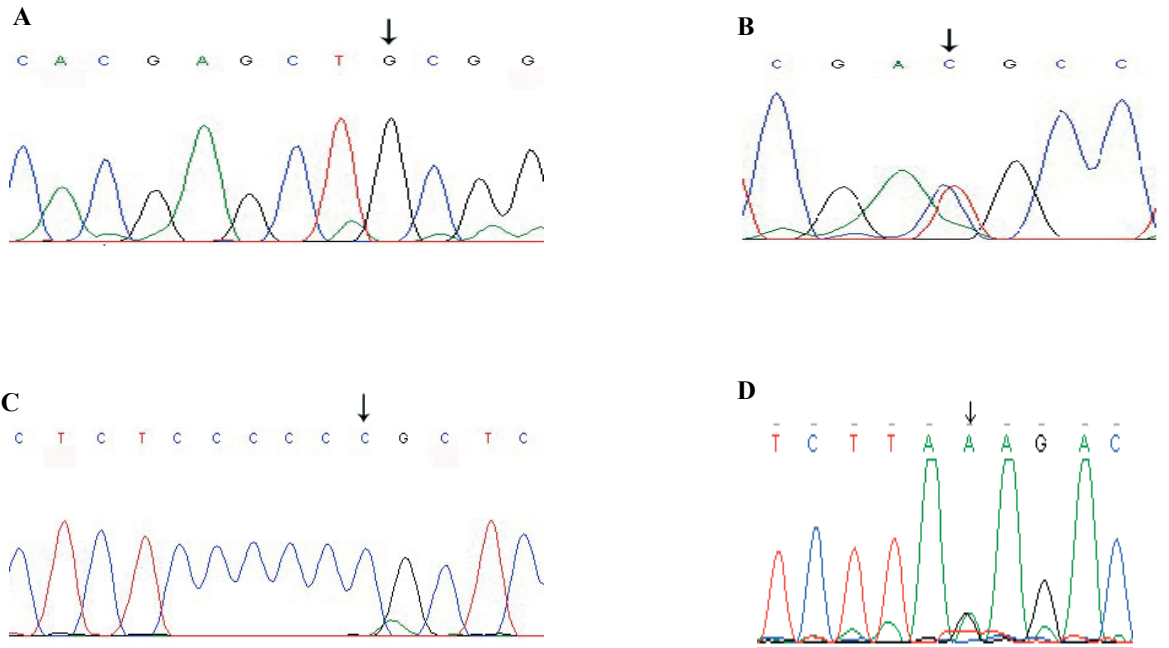
SSCP yöntemi ile taranan *SMAD3* geninin 3. ekzonunda da bant kaymaları tespit edilmiştir. SSCP

sonuçlarını yorumlayabilmek için bant kayması görülen bireylerde yapılan dizi analizi sonucunda 508. nükleotid olan adeninin yerine guaninin geçtiği (c.508A>G) (rs35874463) tespit edilmiştir (Şekil 2C). Farklı bant paternine sahip bireylerin tümünün ise heterozigot karakterde olduğu belirlenmiştir. c.508A>G varyantı genotip ve allel frekansları açısından değerlendirildiğinde aile ve kontrol bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Tablo 2).

SMAD3 geninin 9. ekzonunda ise c.1278G>A transisyonu neticesinde bir sessiz mutasyonun meydana geldiği ve genin son nükleotidindeki bu değişim ile UAG stop kodonunun UAA'ya dönüştüğü görülmüştür (Şekil 2D). Farklı bant paterni tespit edilen iki bireyin de heterozigot karakterde olduğu, kontrol bireylerde ise c.1278G>A transisyonunun bulunmadığı belirlenmiştir (Tablo 2).

Biyokimyasal olarak, ekzon3 c.508A>G polimorfizmine sahip bireylerde (grup I), dijital çomak parmaklılıkla karakterize olup c.508A>G polimorfizmini taşımayan bireylerde (grup II) ve çomak parmaklılık görülmeyen ve c.508A>G polimorfizmine de sahip olmayan bireylerde (grup III) yapılan analizler sonucunda gruplar arasında farklılıklar olmasına rağmen, bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3).

Bireylere ait el-parmak ve akciğer grafileri incelendiğinde, çomak parmaklı bireyler ile normal parmak yapısına sahip bireylerin el-parmak grafileri arasında anlamlı bir farklılık gözlenemezken, akciğer grafilerinde çomak parmaklı bireylerin büyük bir bölümünün aort topuzunun belirgin olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2. (A) V:17 nolu bireye ait 2. ekzondaki c.309A>G transisyonu (homozigot) (B) VII:4 nolu bireye ait intron 2'nin 59. pozisyonundaki G/C transversiyonu (IVS2+59C>G) (homozigot) (C) V:11 nolu bireye ait 3. ekzondaki c.508A>G transisyonu (heterozigot) için ters (reverse) DNA dizi analizi (D) VI:12 nolu bireye ait 9. ekzondaki c.1278G>A transisyonu (heterozigot)

Tablo 1. Aile bireylerine ait *SMAD3* geni DNA dizi analizi sonuçları ve genotipleri

Pedigri No	SMAD3 Nükleotid Değişimleri			
	Ekzon2 (c.309A>G)	İntron2 (IVS2+59 G>C)	Ekzon3 (c.508A>G)	Ekzon9 (c.1278G>A)
V:11	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Heterozigot (AG)	Homozigot (GG)
V:14	Heterozigot (AG)	Homozigot (CC)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
V:17	Homozigot (GG)	Homozigot (GG)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VI:12	Homozigot (GG)	Heterozigot (GC)	Homozigot (AA)	Heterozigot (GA)
VI:14	Heterozigot (AG)	Homozigot (GG)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VI:15	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VI:16	Homozigot (GG)	Homozigot (CC)	Heterozigot (AG)	Homozigot (GG)
VI:23	Homozigot (GG)	Homozigot (GG)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VI:24	Homozigot (GG)	Homozigot (GG)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VII:1	Homozigot (GG)	Homozigot (CC)	Heterozigot (AG)	Homozigot (GG)
VII:3	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VII:4	Homozigot (GG)	Homozigot (CC)	Heterozigot (AG)	Homozigot (GG)
VII:11	Homozigot (GG)	Homozigot (GG)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VII:15	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VII:16	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VII:18	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VII:19	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GA)
VII:20	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Homozigot (AA)	Homozigot (GG)
VII:21	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Heterozigot (AG)	Homozigot (GG)
VII:22	Heterozigot (AG)	Heterozigot (GC)	Heterozigot (AG)	Homozigot (GG)

Tablo 2. Aile ve kontrol grubunda genotip ve allel dağılımları

Polimorfizm	Genotip (n=99) Alleller (n= 198)	Aile (n=20)	Kontrol (n=40)	OR (% 95 Güvenlik Aralığı)	P Değeri
Ekzon2 (c.309A>G)	AA	-	-		
	AG	12 (60.0)	16 (40.0)		0.12
	GG	8 (40.0)	24 (60.0)		
	A	12 (30.0)	16 (20.0)	0.583 (0.244-1.393)	0.16
	G	28 (70.0)	64 (80.0)		
İntron2 (IVS2+59G>C)	GG	5 (25.0)	13 (32.5)		
	GC	11 (55.0)	18 (45.0)		0.75
	CC	4 (20.0)	9 (22.5)		
	G	21 (52.5)	44 (55.0)	1.106 (0.517-2.367)	0.47
	C	19 (47.5)	36 (45.0)		
Ekzon3 (c.508A>G)	AA	13 (65.0)	39 (97.5)		
	AG	7 (35.0)	1 (2.5)		0.001
	GG	-	-		
	A	33 (82.5)	79 (98.75)	16.758 (1.983-141.622)	0.002
	G	7 (17.5)	1 (1.25)		
Ekzon9 (c.1278G>A)	GG	18 (90.0)	40 (100.0)		
	GA	2 (10.0)	-		0.107
	AA	-	-		
	G	38 (95.0)	80 (100.0)	1.053 (0.980-1.130)	0.109
	A	2 (5.0)	-		

Tablo 3. Ailede c.508A>G polimorfizmi ve çomak parmaklılık fenotipine göre oluşturulan gruplarda biyokimyasal değişkenlerin ortalama±standart sapma değerleri ve anlamlılık düzeyleri (Grup1: *SMAD3* c.508A>G için polimorfik bireyler; Grup2: Yalnızca çomak parmaklılık fenotipine sahip bireyler; Grup3: *SMAD3* c.508A>G polimorfizmine ve çomak parmaklılık fenotipine sahip olmayan bireyler)

Parametreler	Grup 1 (n=7)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=6)	P değerleri
	X±SD	X±SD	X±SD	
Hematoloji				
Hemoglobin	14.16±0.88	14.02±1.93	14.00±1.37	0.996
Serum demir	93.57±15.65	92.37±49.35	84.33±22.82	0.993
Hematokrit	40.57±3.01	41.05±5.04	40.23±3.84	0.993
Transferrin	259,28±51.63	255.50±57.29	246.00±27.41	0.299
TDBK	303.71±32.90	333.25±44.63	325.16±25.11	0.215
Proteinler				
Ig G	1481.42±278.35	1287.50±251.32	1466.66±135.59	0.450
Ig M	126.25±56.37	93.85±29.96	117.23±34.08	0.736
Ig A	214.14±73.31	191.00±70.00	257.23±109.23	0.633
Haptoglobulin	116.95±55.75	117.43±30.54	120.40±58.48	0.753
Albümin	4.31±0.27	4.43±0.39	4.68±0.17	0.175
Lipit profili				
Total kolesterol	184.14±11.30	229.37±42.26	220.83±38.75	0.252
Trigliserid	91.85±25.33	110.12±49.68	65.83±15.68	0.146
LDL kolesterol	114.42±8.54	156.00±32.34	158.66±36.39	0.084
HDL kolesterol	44.28±10.19	54.25±9.28	49.16±7.44	0.079
Karaciğer enzimleri				
ALT	14.14±1.5	20.75±12.92	17.16±4.49	0.926
AST	18.71±3.77	26.50±15.74	19.83±4.30	0.549
Alkalen fosfataz	250.85±192.74	196.37±82.90	145.66±21.06	0.714
Laktik dehidrogenaz	329.85±53.77	324.87±43.50	343.33±101.01	0.966
Tümör belirteçleri				
Alfa-1-antitripsin	*	177.14±24.39	153.25±10.75	0.382
CA 19-9	15.73±12.77	11.47±7.53	5.22±3.84	0.249
CA 125	16.87±5.61	10.95±4.70	11.07±4.77	0.248
CA 15-3	23.42±13.18	21.86±5.39	16.70±5.68	0.788
Karsino embriyojenik antijen				
Alfa-fetoprotein	6.51±3.29	7.40±3.54	9.77±6.00	0.559
Hormonlar				
Growth hormon	*	0.95±1.50	0.17±0.08	0.629
Eritropoietin	*	14.90±25.35	10.30±2.14	0.433
T ₃	1.83±0.46	1.56±0.19	1.57±0.27	0.681
T ₄	8.21±2.18	8.48±1.10	7.65±0.93	0.860

* ölçüm yapılmadı

Tartışma

İlk olarak Hipokrat tarafından yaklaşık 2500 yıl önce tanımlanan dijital çomak parmaklılığın % 5-10'luk bölümünü resesif veya dominant olarak kalıtılan ve herhangi sebebe bağlı olmaksızın görülen primer formu oluşturur. Unilateral veya bilateral olarak, bir veya daha fazla parmakta görülebilen dijital çomak parmaklılığın % 90-95'lik bölümünü ise kronik akciğer hastalıkları veya kanseri, Chron hastalığı, tüberküloz, pulmoner fibrozis veya bakteriyel endokarditis gibi hastalıklar neticesinde ortaya çıkan sekonder formu oluşturmaktadır (10, 11).

Uppal ve arkadaşlarının üç primer hypertrophic osteoarthropathy (HOA) ailesiyle yaptığı tüm genom tarama çalışmaları neticesinde, iki Kuzey Pakistanlı ailede 4. kromozomun uzun kolunda 7 Mb'lık bir bölgeye bağlantı görülmüştür (12). İleri çalışmalarla bu bölgede 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD) enzimini kodlayan *HPGD* geninin yer aldığı belirlenmiştir. HPGD enzimi, prostaglandin E2(PGE₂)15(S)-hydroxyl grubununun 15-keto metabolitine indirgenmesinde ilk oksidasyonu katalizlemektedir (13).

HPGD geninde meydana gelen mutasyonlar neticesinde, PGE₂'nin 15-OH grubu ile HPGD arasında hidrojen bağının oluşumunda aksaklıklar meydana geldiği saptanmıştır. Artan PGE₂ seviyesinin ise osteoblast ve osteoklast stimülasyonuna yol açarak kemik yapısındaki değişimleri açıkladığı ortaya konmuştur (14-16).

Primer dijital çomak parmaklılığın görüldüğü 7 kuşaklı bu ailede, bugüne kadar çomak parmaklılık için sorumlu tutulabilen tek gen olan *HPGD* geninin kodlayan dizileri içinde herhangi bir değişikliğin saptanamamış olması olası farklı bir gende meydana gelen nükleotid değişimlerinin bu ailede aynı fenotipin ortaya çıkmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

TGF-β, sinyal iletimi hücre proliferasyonunda önemli bir düzenleyicidir. *SMAD3*'ün tümör oluşumundaki rolü açık olmamasına rağmen son yıllardaki araştırmalar *SMAD3*'ün hücre çoğalmasının inhibisyonu ve apoptozisi artırması yoluyla tümör baskılayıcı işleve sahip olduğunu göstermektedir. *SMAD3* genindeki bozukluklar normal TGF-β sinyal iletimini etkileyebilmekte ve bu da TGF-β sinyal iletiminin bozulması sonucu neoplastik oluşuma yol açabilmektedir (17, 18).

SMAD3 geni için yapılan PCR-SSCP ve DNA dizi analizleri sonucunda, GenBank sekansına (U76622) göre dört farklı nükleotid değişimi belirlenmiştir. Belirlenen değişikliklerden birincisi ekzon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A/G transisyonudur (c.309A>G). Bu değişiklik daha önce tanımlanmış olup bu varyantın herhangi bir amino asit değişikliğine sahip olmadığı belirlenmiştir (19, 20). 309. kodon, *SMAD3* yapısal elemanlarından MH1 domaini içerisinde bulunur. MH1 domaini diziye özgül DNA bağlanma özelliği olan bölgedir ve Smad3 proteinin fonksiyonunda önemli bir yere sahiptir (21). Ayrıca MH1 domaini, MH2 domainin fonksiyonunu

negatif olarak düzenleme yeteneğine sahiptir. 309. kodondaki sessiz transisyonun hem ailedeki dijital çomak parmaklılık ve kansere göre segregasyonu hem de normal popülasyondaki frekansları çomak parmaklılık ve kanser oluşumunda rolünün olmadığını göstermektedir.

Belirlenen ikinci değişiklik ise 3. ekzon içinde yer alan ve 508. nükleotid olan adenininin guanine dönüşümüdür (c.508A>G). 170. kodon olan ATC kodonu izolösini kodlarken; bu değişim neticesinde ortaya çıkan GTC kodonu valini kodlamaktadır. *SMAD3* geninin 170. kodonu çok önemli fosforilasyon alanları içeren bağlantı bölgesinde yer almakta olup yetersiz korunmuş bağlantı (linker) bölgesinde oluşan A/G transisyonun ise koruyucu bir değişiklik olarak varsayılabilir. Çok sayıda serin ve treonin içeren bu bağlantı bölgesindeki farklılıklar, R-Smadların çok yönlü sinyal girişi ile düzenlenmesine olanak sağlamaktadır (22). Dijital çomak parmaklılığın görüldüğü bu ailedeki c.508A>G transisyonuna sahip bireylerin sayısının fazla olması, kontrollerle kıyaslandığında hem genotipik hem de allelik olarak istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde farkın anlamlı olduğu görülmüştür. Fakat pedigrî üzerinde yapılan değerlendirmelerde, hem dijital çomak parmaklılık görülen bireylerin hem de hastalık taşımayan bireylerin c.508A>G transisyonuna sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca aile üzerinde anne veya babadan birinin c.508A>G transisyonunu taşıması çocuklarda aynı transisyonun görülme ihtimalini de arttırmaktadır. Dolayısı ile c.508A>G transisyonu ile dijital çomak parmaklılık arasındaki bir ilişkiden bahsetmemiz mümkün değildir.

SMAD3 genindeki üçüncü değişiklik, daha önce herhangi bir popülasyonda tanımlanmamış olan 9. ekzondaki c.1278G>A transisyonudur. Genin son nükleotidinde görülen bu değişim neticesinde bir sessiz mutasyon meydana gelmekte ve UAG stop kodonu diğer bir stop kodonu olan UAA'ya dönüşmektedir. c.1278G>A transisyonunun aile içerisinde bir hasta ve bir normal bireyde görülmesi, ayrıca hasta olan bireyin çocuklarının da hasta olmasına rağmen aynı transisyonu taşıması c.1278G>A transisyonu ile dijital çomak parmaklılık arasında bir ilişki olmadığını açıkça ortaya koymaktadır. Sonucu değişim ise intron 2'nin 59. pozisyonundaki G/C transversiyonu (IVS2+59 G>C)'dur. Arai ve arkadaşları, Japon popülasyonunda 50 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmada, sağlıklı bireylerdeki genotip frekansını; G/G: % 42, G/C: % 40 ve CC: % 18 olarak bulmuşlardır (19). Çalışmamızda ise aile ve kontrol bireyler arasında, genotip ve allel frekansı açısından istatistiksel olarak herhangi bir anlam bulunamamıştır. Bu transisyon aile içerisinde değerlendirildiğinde de hasta ve normal bireyler arasında da herhangi bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Akciğer ve kolon kanseri vakalarında *SMAD3* mutasyonları tanımlanmış olmasına rağmen, *SMAD3* geninin kodlayan dizileri ve intron-ekzon bağlantılarında

belirlendiğimiz nükleotid değişimlerinin, hem ailedeki dijital çomak parmaklılık ve kansere göre segregasyonu hem de normal popülasyondaki frekansları çomak parmaklılık ve kanser oluşumunda etkin rollerinin olmadığını göstermektedir. Ayrıca *SMAD3* gen aktivasyonunu hipermetilasyonlar, promotor bölge mutasyonları ve RNA-işlenmesi gibi potansiyel alternatif mekanizmalar da etkileyebilmektedir. Bu çalışma, *SMAD3* geninde tespit edilen nükleotid değişimlerinin fonksiyonel birer mutasyon olmadıklarını dolayısıyla dijital çomak parmaklılık ve kanser patogeneğinde rol almadıklarını ve dijital çomak parmaklılıktan sorumlu tutulabilen tek gen olan *HPGD* geninden farklı bir genin daha aynı fenotipi ortaya koyabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Kaynaklar

- [1] Karnath B. (2003) Digital clubbing: A sign of underlying disease. *Hosp Physician*. 26: 25–27.
- [2] Tariq M, Azeem Z, Ali G, Chishti MS, Ahmad W. (2009) Mutation in the *HPGD* gene encoding NAD⁺ dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase underlies isolated congenital nail clubbing (ICNC). *J Med Genet*. 46(1): 14–20.
- [3] Massagué J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67: 753–91.
- [4] Soyöz M, Özçelik N. (2007) TGF-β (Transforming Growth Factor-β) ve Sinyal İletimi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 27: 426–33.
- [5] Attisano L, Wrana JL. (2002) Signal transduction by the TGF-β superfamily. *Science*. 296: 1646–47.
- [6] Yao JY, Wang Y, An J, Mao CM, Hou N, Lv YX, Wang YL, Cui F, Huang M, Yang X. (2003) Mutation analysis of the *Smad3* gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet*. 11: 714–717.
- [7] Pinkas J, Teicher BA. (2006) TGF-beta in cancer and as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol*. 72: 523–29.
- [8] Atkinson S, Fox SB. (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and platelet-derived growth factor (PDGF) play a central role in the pathogenesis of digital clubbing. *J Pathol* 203: 721–28.
- [9] Kitamura S, Maeshima Y, Sugaya T, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H. (2003) Transforming growth factor-1 induces vascular endothelial growth factor expression in murine proximal tubular epithelial cells. *Nephron Exp. Nephrol*. 95: 79–86.
- [10] Vandemergel X, Decaux G. (2003) Review on hypertrophic osteoarthropathy and digital clubbing. *Rev Med Brux*. 24: 88–94.
- [11] Hansen-Flaschen J, Nordberg J. (1987) Clubbing and pulmonary osteoarthropathy. *Clin Chest Med*. 8: 287–298.
- [12] Uppal S, Diggle CP, Carr IM, Fishwick CW, Ahmed M, Ibrahim GH, Helliwell PS, Latos-Bieleńska A, Phillips SE, Markham AF, Bennett CP, Bonthron DT. (2008) Mutations in 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase cause primary hypertrophic osteoarthropathy. *Nature Genetics*. 40: 789–793.
- [13] Tai HH, Ensor CM, Tong M, Zhou H, Yan F. (2002) Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins and Other Mediat*: 68–69: 483–493.
- [14] Jee WSS, Ma YF. (1997) The in vivo anabolic actions of prostaglandins in bone. *Bone*. 21: 297–304.
- [15] Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Yano K, Shibata O, Udagawa N, Yasuda H, Suda T, Higashio K. (1998) Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 246: 337–341.
- [16] Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. (2007) The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *J Endod*. 33: 432–436.
- [17] Han SU, Kim HT, Seong DH, Kim YS, Park YS, Bang YJ, Yang HK, Kim SJ. (2004) Loss of the *Smad3* expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer. *Oncogene*. 23(7): 1333–41.
- [18] Fukushima T, Mashiko M, Takita K, Otake T, Endo Y, Sekikawa K, Takenoshita S. (2003) Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad6* and *Smad7* genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 22(2): 315–20.
- [19] Arai T, Akiyama Y, Okabe S, Ando M, Endo M, Yuasa Y. (1998) Genomic structure of the human *Smad3* gene and its infrequent alterations in colorectal cancers. *Cancer Lett*. 122(1–2): 157–63.
- [20] Roth S, Sistonen P, Salovaara R, Hemminki A, Loukola A, Johansson M, Avizienyte E, Cleary KA, Lynch P, Amos CI, Kristo P, Mecklin JP, Kellokumpu I, Järvinen H, Aaltonen LA. (1999) *SMAD* genes in juvenile polyposis. *Genes Chrom Cancer*. 26(1): 54–61.
- [21] Chai J, Wu J, Yan N, Massague J, Pavletich NP, Shi Y. (2003) Features of a *Smad3* MHI-DNA Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(22): 20327–31.
- [22] Sapkota G, Knockaert M, Alarcón C, Montalvo E, Brivanlou AH, Massagué J. (2006) Dephosphorylation of the Linker Regions of *Smad1* and *Smad2/3* by Small C-terminal Domain Phosphatases Has Distinct Outcomes for Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor-β Pathways. *J Biol Chem*. 281(52): 40412–19.